

## Metode identifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* secara biokimia



© BSN 2009

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Mangala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Prinsip.....	2
4 Peralatan .....	2
5 Bahan .....	3
6 Prosedur .....	3
7 Pelaporan .....	5
Lampiran A (normatif) Pembuatan media.....	6
Lampiran B (normatif) Pembuatan pereaksi .....	7
Bibliografi .....	9
Tabel 1 - Kriteria bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	5



## Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan budidaya serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Metode identifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* secara biokimia.

Standar ini disusun oleh Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya, melalui konsensus pada tanggal 6 - 9 Nopember 2006 di Bogor, Jawa Barat yang dihadiri oleh Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

- 1 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.

Standar ini juga telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal 21 Juni 2007 sampai dengan 21 September 2007 dan tahap pemungutan suara pada tanggal 12 Juni 2008 sampai dengan 12 Agustus 2008, namun untuk mencapai kuorum diperpanjang sampai dengan tanggal 12 September 2008 dan langsung disetujui menjadi RASNI.



## Metode identifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* secara biokimia

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan prosedur identifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* secara biokimia.

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### **contoh ikan**

sejumlah kecil dari suatu populasi ikan yang digunakan untuk pemeriksaan dan memenuhi persyaratan secara statistika

#### 2.2

##### **Gram negative**

hasil pewarnaan *Gram* yang ditandai dengan sel bakteri yang berwarna merah

#### 2.3

##### **ikan besar**

ikan yang sudah dapat dibedakan organ dalamnya secara makroskopis

#### 2.4

##### **ikan kecil**

ikan yang tidak dapat dibedakan organ dalamnya secara makroskopis

#### 2.5

##### **inkubasi**

pengkondisian bakteri untuk tumbuh dan berkembangbiak sesuai dengan suhu dan waktu yang diperlukan

#### 2.6

##### **inokulasi**

menumbuhkan bakteri dari satu media ke media lain

#### 2.7

##### **isolasi**

pemisahan bakteri dari organ target dari ikan dengan menumbuhkan pada media agar

#### 2.8

##### **isolat murni**

bakteri hasil pemurnian dari koloni yang terisolir

#### 2.9

##### **media O/F**

media yang digunakan untuk uji *Oksidatif - Fermentatif*

#### 2.10

##### **media RS (*Rimler Shott*)**

uji yang dilakukan untuk menumbuhkan bakteri spesifik *Aeromonas hydrophila*



## 2.11

### **media umum**

media yang umum digunakan untuk penumbuhan bakteri

## 2.12

### **organ target**

organ yang menjadi sasaran infeksi patogen dan digunakan sebagai objek pemeriksaan

## 2.13

### **pewarnaan *Gram***

uji untuk mengetahui morfologi bakteri dan membedakan sifat dinding sel bakteri dengan menggunakan pewarna *Gram*

## 3 Prinsip

Mengisolasi dan memurnikan bakteri pada media umum kemudian diidentifikasi secara morfologi dan uji biokimia.

## 4 Peralatan

- a) *laminarflow-hood (safety cabinet)*;
- b) peralatan bedah;
- c) meja bedah;
- d) cawan petri;
- e) labu erlenmeyer;
- f) tabung reaksi;
- g) jarum *Öse*;
- h) bunsen;
- i) pipet tetes;
- j) pipet berskala;
- k) tangkai kaca (*hockey stick*);
- l) mortar;
- m) *autoclave*;
- n) *vortex mixer*;
- o) timbangan analitik dengan ketelitian 0,01 g;
- p) oven;
- q) inkubator;
- r) *hot plate stirrer*;
- s) *magnetic stirrer*;
- t) botol semprot;
- u) rak tabung reaksi;
- v) alat tulis;
- w) mikroskop;
- x) *refrigerator*;
- y) pensil kaca.



## 5 Bahan

- a) media umum (TSA, BHI, NA);
- b) akuades;
- c) alkohol 70 %;
- d) alkohol aseton;
- e) larutan *crystal violet*;
- f) larutan *iodine-lugol*;
- g) larutan *safranin*;
- h) larutan *tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride* 1 % dalam akuades (*reagen oksidase*);
- i) *O/F basal medium*;
- j) larutan glukosa 10 % disterilkan secara filterisasi;
- k) *O/129 disc*;
- l) *paraffin oil steril*;
- m) RS medium;
- n) SIM agar;
- o) kertas label;
- p) *paraffin*;
- q) *aluminium foil*;
- r) *filter paper*.

**CATATAN** Pembuatan media diuraikan dalam Lampiran A dan pembuatan pereaksi diuraikan dalam Lampiran B.

## 6 Prosedur

### 6.1 Preparasi contoh

#### 6.1.1 Ikan besar

- a) Bersihkan permukaan tubuh ikan dengan kapas yang telah dibasahi alkohol 70 %.
- b) Bedah ikan menggunakan peralatan bedah steril, ambil organ target (hati, ginjal, limpa), dan sterilkan permukaannya kemudian siap dilakukan isolasi. Isolasi dapat juga dilakukan dari permukaan tubuh yang luka, atau sediaan darah.

#### 6.1.2 Ikan kecil dan telur

Ambil contoh, dibilas dengan menggunakan akuades steril minimal 3 kali, kemudian ikan digerus, contoh siap untuk diisolasi.

### 6.2 Isolasi bakteri

- a) Bersihkan permukaan meja kerja/*clean bench* dengan alkohol 70 %.
- b) Tusuk organ target dengan jarum *Öse steril* secara aseptis kemudian goreskan ke media agar.
- c) Gerus benih dan telur secara aseptis, kemudian ambil hasil gerusan dengan jarum *Öse steril* dan goreskan ke media agar.
- d) Inkubasikan pada suhu 25 °C selama 18 jam - 24 jam.



### 6.3 Pemurnian koloni

- Ambil koloni yang tumbuh terpisah di dalam goresan yang diduga *Aeromonas hydrophila* untuk selanjutnya dimurnikan.
- Apabila hasil pemurniannya diperoleh koloni yang seragam maka diteruskan dengan uji lanjutan.

### 6.4 Tahap analisa

#### 6.4.1 Pewarnaan Gram

- Siapkan gelas objek yang telah dibersihkan dari lemak dengan alkohol 70 % dan diberi label.
- Tetaskan 1 tetes akuades steril pada permukaan gelas objek.
- Ambil isolat dengan jarum *Öse steril*, campur dengan akuades dan diulas merata pada permukaan gelas objek.
- Fiksasikan dengan melewati preparat di atas api (jarak 15 cm) beberapa kali sampai terlihat kering.
- Tetaskan larutan *crystal violet* pada preparat sampai merata dan diamkan selama 1 menit.
- Cuci dengan air mengalir.
- Tetaskan larutan *iodine lugol* pada preparat sampai merata, dan diamkan selama 1 menit.
- Cuci preparat dengan air mengalir dan dikeringanginkan.
- Tetaskan larutan alkohol *aseton* pada preparat sampai merata dan diamkan maksimal 30 detik.
- Cuci preparat dengan air mengalir dan dikeringanginkan.
- Tetaskan larutan *safranin* pada preparat sampai merata dan diamkan selama 2 menit.
- Cuci preparat dengan air mengalir dan dikeringanginkan.
- Amati preparat menggunakan mikroskop.
- Sifat bakteri *Gram* negatif ditandai dengan sel bakteri berwarna merah/pink, bentuk batang pendek.

#### 6.4.2 Uji motilitas

- Ambil isolat dengan jarum *Öse* lurus, dan inokulasikan dengan menusukkan pada media semi solid (SIM agar, MIO agar).
- Inkubasikan pada suhu 25 °C - 28 °C selama 18 jam - 24 jam.
- Reaksi positif ditandai oleh adanya pertumbuhan bakteri yang menyebar dan tidak terlihat bekas tusukan.

#### 6.4.3 Uji oksidase

- Basahi kertas saring dengan pereaksi oksidasi.
- Ambil 1 *loop* isolat bakteri, goreskan pada kertas saring yang sudah diberi *reagen* oksidasi.
- Reaksi oksidasi positif ditandai munculnya warna biru keunguan pada goresan.

#### 6.4.4 Uji oksidatif-fermentatif

- Siapkan 2 tabung berisi media O/F.
- Ambil isolat bakteri dengan jarum *Öse steril*.
- Inokulasikan isolat bakteri ke dalam tabung yang berisi media O/F dengan cara ditusukkan.
- Satu tabung diisi dengan parafin cair steril hingga ketinggian 1 cm di atas permukaan media O/F, sedangkan tabung lainnya tanpa parafin cair.
- Reaksi fermentatif ditandai perubahan warna media pada tabung yang diisi parafin cair dari hijau menjadi kuning.



#### 6.4.5 Uji Rimmner-Shotts (RS)

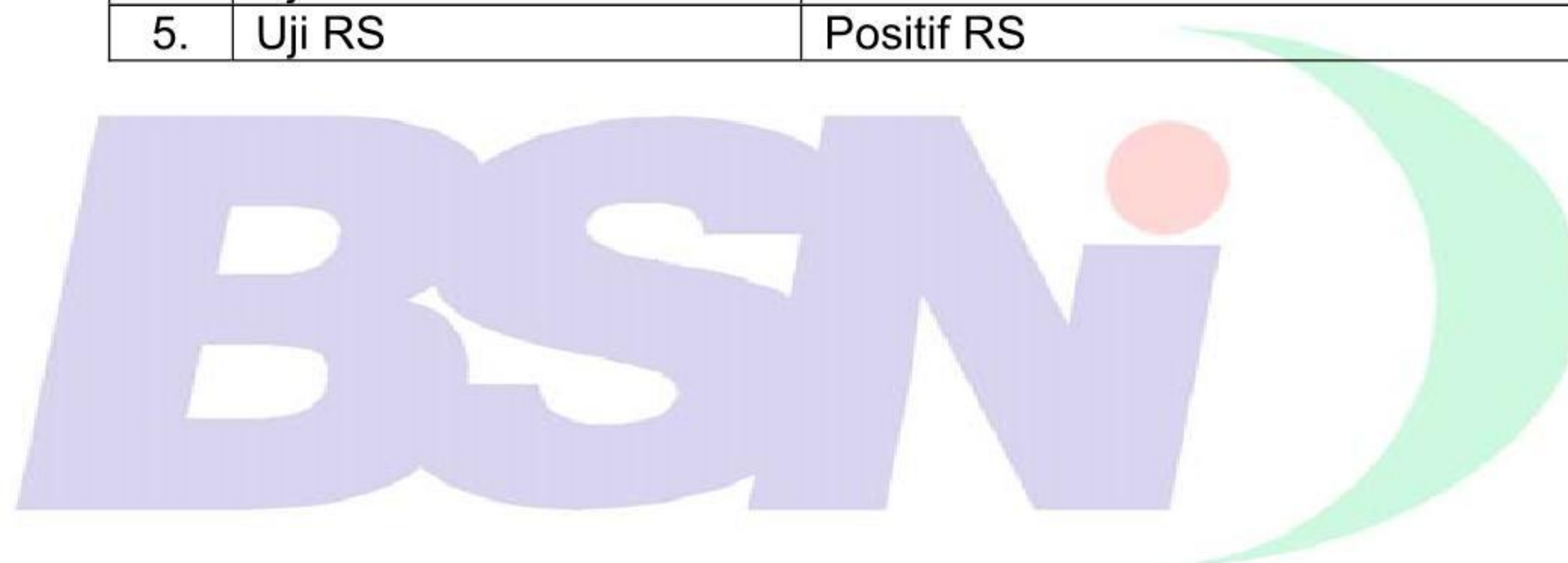
- Ambil isolat bakteri dengan jarum *Öse steril* dan goreskan pada media RS.
- Inkubasikan pada suhu 37 °C selama 18 jam - 24 jam.
- Amati koloni yang tumbuh, apabila berwarna kuning tanpa warna hitam di tengah koloni berarti positif *Aeromonas hydrophila*.

## 7 Pelaporan

Bakteri dinyatakan sebagai *Aeromonas hydrophila* apabila memenuhi kriteria seperti pada Tabel 1.

**Tabel 1 - Kriteria bakteri *Aeromonas hydrophila***

No.	Test	Hasil reaksi
1.	Pewarnaan <i>Gram</i>	Gram negatif, bentuk batang pendek
2.	Uji motilitas	Motil
3.	Uji oksidasi	Positif oksidatif
4.	Uji oksidatif-fermentatif	Positif O/F
5.	Uji RS	Positif RS





## Lampiran A (normatif) Pembuatan media

### A.1 *Typticase (tryptic) soy agar* TSA komersial

Cara membuat:

- a) Larutkan 40 g TSA dalam 1 l ( $1 \times 10^{-3} \text{ m}^3$ ) akuades, panaskan sampai mendidih.
- b) Sterilisasi pada suhu 121 °C, selama 15 menit, tekanan 1 atm.

### A.2 Media O/F Media O/F komersial

Cara membuat:

- a) Campurkan 9,4 g O/F basal medium dengan 1 l air, panaskan hingga mendidih tambahkan 1 % glukosa.
- b) Pipet 3 ml ke dalam tabung reaksi, sterilisasi.

### A.3 Media RS

<i>L-lysine hydrochloride</i>	5.0 g
<i>L-ornithine hydrochloride</i>	6.5 g
<i>L-cysteine hydrochloride</i>	0.3 g
<i>Maltose</i>	3.5 g
<i>Sodium thiosulphate</i>	6.8 g
<i>Ferric ammonium citrate</i>	0.8 g
<i>Sodium deoxycholate</i>	1.0 g
<i>Sodium chloride</i>	5.0 g
<i>Yeast extract</i>	3.0 g
<i>Novobiocin</i>	0.005 g
<i>Bromothymol blue</i>	0.03 g
<i>Agar</i>	13.5 g

Cara membuat:

- a) Campurkan bahan di atas dan larutkan dalam 1 l akuades dengan *stirring*;
- b) Atur keasaman pH 7 dan didihkan selama 1 menit.



**Lampiran B**  
(normatif)  
**Pembuatan pereaksi**

**B.1 Pereaksi pewarnaan Gram****B.1.1 Larutan *cristal violet***

Bahan:

<i>Cristal violet</i>	2 g
<i>Etanol</i>	20 ml
<i>Ammonium oxalat</i>	0.8 g
Akuades	80 g

Cara membuat:

- a) Larutkan *Crystal violet* ke dalam etanol.
- b) Larutkan *ammonium oxalat* ke dalam akuades.
- c) Campurkan kedua larutan, biarkan selama 24 jam sebelum penyaringan.

**B.1.2 Larutan *iodine***

Bahan:

<i>Iodine</i>	1 g
<i>Potassium iodide</i>	2 g
Akuades	300 ml

Cara membuat:

- a) Larutkan *Potassium iodide* ke dalam 20 ml akuades.
- b) Tambahkan *Iodine* dan biarkan selama semalam.
- c) Tambahkan sisa akuades.

**B.1.3 Larutan penjernih**

Bahan:

<i>Ethanol</i>	95 ml
<i>Acetone</i>	5 ml

**B.1.4 Larutan safranin**

Bahan:

<i>Safranin</i>	0.25 g
<i>Ethanol</i> (95%)	10 ml
Akuades	90 ml

Cara membuat:

Larutkan *safranin* ke dalam *ethanol* dan akuades.



## B.2 Pereaksi uji oksidasi

### Larutan oksidasi

Bahan:

<i>Tetramethy-p-phenylenediamine dihydrochloride</i>	1 ml
Akuades	99 ml

Cara membuat:

Larutkan *tetramethy-p-phenylenediamine dihydrochloride* ke dalam akuades.





## Bibliografi

Jean F. Mac Faddin, MS, MT(ASCP), SM (AAM), SFC, USA Retired. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 2<sup>nd</sup>. 1983.

John G. Holt, Noel R.Krieg, Peter H.A. Sneath, James T.Stanley, Stanley T. Williams. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup>. 1983.

Nicolas Frerichs G, BVMS, PhD, MRCVS, Dip.Bact dam Stuart D. Millar, Cbiol, MLBiol. *Manual for The Isolation and Identification of Fish Bacterial Pathogens*. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Schotland. 1993.















**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.or.id](mailto:bsn@bsn.or.id)